

La terapia larval en el contexto de sus características, avances y perspectivas

Felio J. Bello García¹

¹Ph D. Profesor e Investigador, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia

Introducción

La terapia larval, biocirugía, bioterapia o terapia de desbridamiento larval es el uso de larvas asépticas de moscas de la familia Calliphoridae en el tratamiento de heridas crónicas de difícil cicatrización (Figura 1). Estas heridas incluyen, entre otras, úlceras causadas por enfermedades vasculares (venosas, arteriales y mixtas), por infección crónica, úlceras por presión y aquellas generadas por complicaciones diabéticas (Horobin *et al.* 2003).

A medida que la población envejece, el número de pacientes que sufren de heridas crónicas, atribuibles a enfermedades sistémicas de base, ha venido en aumento, tales patologías más comunes son: diabetes mellitus y enfermedad vascular periférica. Esta situación genera un impacto significativo sobre el sistema de salud, debido a la persistencia de los cuidados que requieren los pacientes y a los costos asociados con su manejo. En Inglaterra, por ejemplo, se hizo un estimativo anual de 1 billón de libras de esterlinas en gastos por parte del Servicio Nacional de Salud (NAO, 2004) (Harding *et al.* 2002) y a nivel mundial los costos en los tratamientos anuales de las heridas crónicas podría estar en el orden de los 12 billones de dólares (Harding *et al.* 2002; Frykberg *et al.* 2006). En los anteriores gastos no se incluyen las incapacidades laborales, representadas en dos millones de días de trabajos perdidos (McGuckin y Kerstein 1998), y las secuelas que ocasionan estas lesiones, cuyos valores podrían ser incalculables, además del impacto negativo que tienen en la calidad de vida de los pacientes y de sus familias.

Las heridas, de acuerdo con el tiempo de evolución en el proceso de cicatrización, se dividen en dos tipos: agudas y crónicas. Las primeras se caracterizan por la curación completa en el tiempo previsto y por no presentar complicaciones, en tanto que las agudas se mantienen retrasadas en el tiempo de curación y es común la ausencia de crecimiento de los tejidos, en razón a que se detienen en la fase inflamatoria, por lo general debido a un proceso patológico subyacente, tales como diabetes o insuficiencia vascular. Se ha demostrado científicamente que la terapia larval es una alternativa efectiva, segura y económica para el tratamiento de este último tipo de heridas que mantienen tejido necrótico y, por lo general, están infectadas. La acción de las larvas sobre las heridas ocurre a través de tres mecanismos estrechamente relacionados: limpieza del tejido necrótico, eliminación de bacterias y microorganismos y estimulación en el crecimiento

del tejido de granulación (Church 1996; Thomas *et al.* 1999; Sherman *et al.* 2000; Mumcuoglu 2001; Wolff & Hansson 2005; Spilsbury *et al.* 2008).

En la actualidad, la terapia larval es corrientemente utilizada por médicos de diferentes clínicas y hospitales en muchos países del mundo como Israel, Alemania, Inglaterra, Suiza, Suecia, Australia, Ucrania, Tailandia, los Estados Unidos, Canadá, México, Brasil, Perú, Chile y Argentina (Mumcuoglu *et al.* 1998). En Colombia se ha venido utilizando hace ya varios años (Wolff *et al.* 2010; Rey *et al.* 2010, Téllez *et al.* 2012); sin embargo, aun no está regulada legalmente para uso en pacientes humanos.

En la presentación del tema de terapia larval, revisaremos las características, los avances logrados a la fecha y las perspectivas futuras.

Características de la terapia larval

Reseña histórica. La utilización de larvas de insectos, y en especial dípteros, en el manejo y curación de heridas ha sido una técnica practicada desde varios siglos atrás. Sus efectos benéficos han sido reportados en libros como la Biblia (Job 7:5) y el *Hortus sanitus*, manual médico publicado en Maguncia, Alemania, en 1491 (Dunbar 1944). Otros datos encontrados sobre el uso de la biocirugía como técnica para el tratamiento de heridas datan de la guerra civil en Estados Unidos, donde se describen infestaciones oportunistas por larvas de moscas que ayudaban a limpiar las heridas y a impedir su contaminación (Chernin 1986).

Sin embargo, hace casi 70 años, el verdadero pionero de la biocirugía fue William Baer, cirujano y ortopedista Norte Americano, quien observó los beneficios de las larvas en heridas traumáticas, durante la primera guerra mundial cuando comenzó a utilizarlas durante su práctica. Baer estudió sus efectos en 89 pacientes con osteomielitis crónica reportando resultados positivos en un 90%, dado que las larvas utilizadas por Baer no estaban esterilizadas, algunos de sus pacientes llegaron a infectarse con *Clostridium tetani*. Por otro lado, este suceso hizo que en los siguientes años se dedicara a desarrollar un método eficaz para producir larvas estériles (Baer 1931). Hacia los años cuarenta, la introducción de los antibióticos como las sulfonamidas y la penicilina en el manejo y cuidado de las heridas tuvo un efecto dramático en la terapia de desbridamiento larval de heridas infectadas, al desaparecer esta técnica casi por completo (Baer 1931; Stewart 1934; Thomas *et al.* 1996).

Durante los años noventa del siglo pasado, el uso de la terapia larval fue retomado por Ronald Sherman, médico y profesor de la Universidad de California, quien empezó a utilizar esta técnica en el tratamiento de úlceras generadas por presión y heridas crónicas, motivado por la resistencia de las bacterias a los antibióticos y, en general, debido a la escasa eficacia de los tratamientos convencionales sobre este tipo de lesiones (Sherman *et al.* 1993). A partir de entonces, esta tecnología se ha venido usando, extendidamente, en muchos países del mundo.

Dípteros utilizados en terapia larval. Las larvas de la mosca *Lucilia. sericata* (Diptera: Calliphoridae) son consideradas las más eficaces para ser empleadas en los tratamientos de terapia larval (Namias 2000; Huberman *et al.* 2007) (Figura 1). Las características biológicas y etológicas que hacen a las larvas de *L. sericata* las más convenientes para utilizar en biocirugía incluyen su rápido desarrollo larval, la relativa facilidad para criar estos insectos en condiciones de laboratorio y la continua disposición para la toma de los huevos y su esterilización. No obstante, lo más relevante en el comportamiento biológico es la acción efectiva de las larvas al actuar como parásitos facultativos que se alimentan sólo del tejido necrótico en las heridas, sin intervenir los tejidos vivos del hospedero. Sin embargo, se han obtenido buenos resultados empleando larvas de *Lucilia caesar*, *Phormia regina*, *Calliphora erythrocephala*, *Cynomyia cadaverina* y más recientemente *Lucilia cuprina* y *Lucilia eximia* (Tarshis 1938; Sherman y Pechter 1988; Paul *et al.* 2009; Wolff *et al.* 2010).



Figura 1. A. Secuencia de heridas tratadas con terapia larval, al inicio, durante y al final del tratamiento. Archivo laboratorio de Entomología Médica y Forense, Universidad del Rosario. B. Ciclo de vida de *Lucilia sericata*. Archivo laboratorio de Entomología Médica y Forense, Universidad del Rosario.

Mecanismos usados en la curación de las heridas. Las larvas al interior de las heridas efectúan tres funciones importantes, mediante las cuales contribuyen a la cicatrización de las heridas, éstas son:

1. Desbridamiento. Se ha podido demostrar que cuando la larva se encuentra con su cabeza en contacto con la herida o lesión y en especial sus espiráculos, éstos pueden disolver rápidamente el tejido muerto como resultado de la secreción y excreción colectiva de enzimas proteolíticas, las cuales incluyen colagenasa y otras enzimas que poseen la misma actividad de la tripsina, leucinaminopeptidasa y carboxipeptidasas A y B. Las enzimas digieren la matriz extracelular e incrementan el grado de oxigenación tisular de manera que el tejido necrótico es eliminado. Las larvas son en efecto fábricas químicas vivientes. Ellas se mueven sobre la superficie de la lesión secretando una mezcla de enzimas proteolíticas que disuelven el tejido muerto para que posteriormente este líquido sea succionado e ingerido (Jones y Thomas 2000).

2. Desinfección. Una vez el tejido necrótico ha sido enzimáticamente licuado, la larva ingiere y digiere la “sopa” resultante. Esta acción implica que cualquier bacteria y posiblemente otros microorganismos presentes sean subsecuentemente lisados cuando pasan por el tracto digestivo de la larva. La actividad antibacteriana parece estar mediada por varios componentes entre los cuales se encuentra un comensal del intestino de la larva el *Proteus mirabilis* y dos agentes con actividad antibacterial identificados como ácido fenilacético y fenilacetaldehído con particular acción en el pH bajo del intestino (Sherman *et al.* 2000; Nigam *et al.* 2006).

Otros mecanismos utilizados son la excreción de bicarbonato de amonio y sus derivados al medio ambiente (herida), neutralizando el exudado ácido producido por la inflamación de la herida o la lesión, elevando así el pH por encima de 7 y por ende reduciendo la colonización de bacterias (Mecer y McClellan 1935). El carbonato de calcio también encontrado en las excreciones de la larva estimula la fagocitosis gracias a los iones de calcio facilitando el proceso de cicatrización en heridas infectadas.

Las excreciones y secreciones (ES) larvales, externalizadas en las heridas, las cuales contienen compuestos de bajo peso molecular y metabolitos, han demostrado en condiciones *in vitro* actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Harris *et al.* 2009). Además, algunos de estos compuestos antimicrobiales pueden estar también relacionados con la respuesta inmune del insecto, que en este caso es activada durante la terapia de desbridamiento larval, se destacan entre otros las siguientes proteínas: homóloga de la sapecina-B, serina proteasa y tres nuevos péptidos antimicrobiales ricos en prolina y lisozima. Finalmente, otra acción de eliminación de bacterias en las heridas ocurre mediante el lavado mecánico de estos microorganismos como resultado del incremento de exudado, debido al efecto irritante de las larvas (Wollina *et al.* 2002) y por la liquefacción enzimática del tejido necrótico (Ziffren *et al.* 1953).

3. Estimulación del tejido de granulación. Las iniciales teorías sobre el efecto de las larvas en las heridas señalaban como importante la acción física de las larvas, a través de sus movimientos de rastreo en la lesión, para la estimulación del tejido de granulación en el proceso de curación (Buchman y Blair 1932). Este criterio fue también, más tarde, apoyado por la observación de que las larvas mejoraban la oxigenación del tejido en heridas crónicas (Wollina *et al.* 2002). Además, desde hace mucho tiempo, científicos sugirieron que la acción de algunas sustancias excretadas por *L. sericata* como alantoina (2,5-Dioxo-4-imadazolidinil úrea) o bicarbonato de amonio (Robinson 1935, 1940) podrían ser los responsables del crecimiento del tejido de granulación. En efecto, Robinson (1935), usando estas sustancias en las heridas demostró estimulación en el crecimiento local del tejido de granulación.

Relativamente en fecha más reciente, Prete (1997), encontró que las secreciones alimentarias y la hemolinfa de *L. sericata* al actuar sobre tejidos de fibroblastos humanos estimulaban la proliferación celular. Además, este autor pudo observar que en presencia de concentraciones estimuladoras de factores de transformación del crecimiento, los extractos de las larvas causaban significativo crecimiento de los fibroblastos. Otros investigadores han señalado que la proliferación de los fibroblastos es sólo un aspecto de la formación del tejido de granulación, y al parecer mecanismos adicionales pueden estar involucrados. Así por ejemplo, Chambers *et al.* (2003), indicaron que cuando las larvas son introducidas en heridas necróticas, ellas potencialmente influyen en los eventos de la cicatrización de la herida con proteasas presentes en las ES las cuales están involucradas en la remodelación de los componentes de la matriz extracelular. Estos autores sugieren que las proteinasas causan la lisis de fibrina de la matriz extracelular, liberando factores proliferativos, tales como fragmentos de fibronectina, que causan efectos favorables en la cicatrización de la herida. Los anteriores investigadores creen que un particular tipo de enzimas con actividad similar a la tripsina puede jugar un rol importante en el receptor activador de la proteasa que media en la proliferación de citoquinas en la herida (Horobin 2003, Nigam 2006).

Avances relevantes en el conocimiento de esta tecnología

Las tres objeciones más comunes a la terapia larval durante la década de 1930 fueron: la dificultad para diseñar apósitos, la limitante en la obtención de larvas viables, libres de gérmenes y su alto costo (Sherman 2009). El desarrollo de mejores adhesivos y tejidos sintéticos proporcionan, en la actualidad, muchos métodos convenientes y asequibles para la construcción de vendajes e incluso se han diseñado apósitos en forma de bolsa para mantener las larvas dentro de las heridas, evitando así su fuga (Sherman 1997; Grassberger y Fleischmann 2002). También se han mejorado los procesos de colonización, cría masiva y desinfección de las larvas, simplificando de esta forma el manejo y la producción (Sherman 1996). Por otro lado, los servicios de mensajería a cualquier parte del mundo y con disponibilidad las 24 horas del día, han hecho que sea relativamente fácil la distribución y entrega certificada de las larvas para usar en biocirugía desde, por ejemplo, un

laboratorio que las produce en Inglaterra hasta otro país en cualquier latitud del orbe (Sherman 2009).

Los blancos predilectos, donde se han enfocado las investigaciones sobre biocirugía, han sido las ES larvales, precisamente porque a través de estas sustancias es como las larvas ejercen sus funciones en el proceso de cicatrización de las heridas. Por tal razón, los resultados que se han alcanzando en las dos últimas décadas presentan avances significativos en relación con los mecanismos de desbridación enzimática, actividad antibacterial y estimulación del tejido de granulación.

El mecanismo básico del desbridamiento larval ha sido descrito por varios investigadores. Las larvas efectúan un tipo de digestión extracelular y los jugos digestivos son secretados en las heridas para desbridar el tejido necrótico. Se ha podido demostrar, a la fecha, que existe una gama de enzimas digestivas: serina proteasas (como tripsina y quimotripsina), carboxipeptidasas, leucinoaminopeptidasas, colagenasas, metaloproteinasas y aspartil proteinasas. De forma conjunta, la acción mecánica de las larvas y la secreción de sus enzimas proteolíticas son los responsables de la degradación del tejido necrótico en el eficiente proceso de desbridamiento. Recientemente se han elaborado, mediante técnicas de DNA recombinante, sustancias desbridantes (por ej. quimotripsina I) a partir de genes aislados de *L. sericata* que en condiciones experimentales demostraron degradar escaras, ex-vivo, provenientes de pacientes con heridas crónicas, lo cual permitió efectuar desbridamiento sin la participación de las larvas dentro de las heridas (Telford *et al.* 2010). Otro hecho significativo y novedoso fue el descubrimiento de DNAsa larval, secretado por *L. sericata*, como una molécula que participa en el desbridamiento clínico de heridas mediante la eliminación de ADN extracelular de tejido necrótico y de biopelículas de bacterias adheridas a éste (Jiang *et al.* 2012).

La presencia de compuestos antibacterianos ha sido identificada en las ES por un número importante de investigadores. Se ha demostrado que compuestos y metabolitos de las ES tiene un efecto inhibitorio sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De igual manera, estas sustancias son diferencialmente efectivas contra biopelículas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Van der Plas *et al.* 2008, Cazander *et al.* 2009). También, se ha establecido que el amoníaco excretado por las larvas aumenta el pH de la herida, creando así un ambiente desfavorable para el crecimiento bacteriano (Sherman y Wyle 2000).

En razón a que las heridas crónicas se encuentra estacionadas en la fase inflamatoria, se ha podido demostrar que las secreciones de las larvas inhiben la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-12p40) y a su vez los monocitos ácidos estimulados por compuestos lipopolisacáridos y lipoprotéicos mejoran la producción de citoquinas antiinflamatorias IL-10. Adicionalmente, las secreciones larvales alteran el perfil de quimoquinas de los monocitos por baja regulación de la proteína inflamatoria β de los macrófagos y también por la sobrerregulación de las proteínas quimioatrayentes 1 y IL-8. Se concluye que las secreciones larvales inhiben la respuesta proinflamatoria de los monocitos a través del mecanismo dependiente del AMP-cíclico

(Van der Plas 2009). Esta regulación de los procesos inflamatorios contribuye al avance de la cicatrización en heridas crónicas.

En el proceso de la estimulación para el crecimiento del tejido de granulación, las proteinasas, tanto de las ES larvales como de otras fuentes, presentes en las heridas, están asociadas con la migración de los fibroblastos, también con la proliferación, angiogénesis, repitelización y remodelación del tejido. Así mismo, las proteinasas alteran las interacciones entre los fibroblastos y la matriz extracelular, confluyendo todo este mecanismo fisiológico en la cicatrización de la herida (Horobin *et al.* 2003). El efecto proliferativo, demostrado selectivamente sobre células endoteliales, indica que los aminoácidos presentes en las ES larvales juegan un rol importante en la estimulación de la angiogénesis (Bexfield *et al.* 2009).

Perspectivas de la terapia larval

En razón a que a los avances en las investigaciones sobre terapia larval cada día amplían el conocimiento sobre la acción fisiológica de las ES larvales sobre las heridas crónicas, la tendencia, por parte de varios grupos de investigadores dedicados a este campo, es aislar los compuestos y metabolitos de esta mezcla para luego de un integral esclarecimiento del papel que cumplen en las úlceras, usar herramientas biotecnológicas para producirlas en gran escala. Seguramente, hacia el mediano plazo, estas sustancias podrían ser convertidas en drogas que se emplearán en el desbridamiento, en la acción antimicrobial y, también, en la promoción del estímulo inmunológico necesario del paciente para obtener una eficaz y rápida cicatrización de las heridas crónicas. Lo anterior conduciría, eventualmente, a sustituir las larvas por estas futuristas moléculas. Sin embargo, algunos investigadores consideran que no es una tarea nada fácil igualar la acción de las larvas respecto de aquellas que eventualmente ejercerían las moléculas de laboratorio y, por lo tanto, señalan que la acción mecánica desarrollada por estos organismos sobre las heridas, al usar algunas estructuras orgánicas para raspar el tejido necrótico, oxigenar el ambiente interno y permitir a las enzimas acceder al tejido más profundo, además de reconocer que la mezcla de moléculas secretadas es compleja y sinérgica, en el caso particular de Sherman sobre el tema afirma lo siguiente: “si las moléculas purificadas resultan menos eficaces que las larvas vivas, seguramente a alguien se le ocurra desarrollar larvas robot para que suplan a éstas en la liberación de las moléculas en las heridas” (Sherman 2009).

Conclusiones

La terapia larval es una técnica segura y eficaz para la curación de heridas necróticas y crónica de difícil cicatrización. Se conoce desde los tiempos antiguos pero el padre de esta tecnología, por sus aportes en la fundamentación científica y su práctica clínica (1928-1931) fue William Baer. La bioterapia se utilizó ampliamente en clínica y hospitales durante el periodo comprendido entre 1930-1940. Sin embargo, el uso de los antibióticos recién descubiertos y las nuevas técnicas

quirúrgicas hicieron que esta tecnología fuera abandonada. No obstante, se retomó en la década de los años noventa, paradójicamente, como consecuencia de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos. En la actualidad es de uso corriente en muchos países del mundo. La acción de las larvas en las heridas, en el proceso de curación, se efectúa mediante tres mecanismos: desbridación, acción antibacterial y estimulación del tejido de granulación. *Lucilia sericata* es la mosca universalmente utilizada en bioterapia. Se han efectuado avances importantes, tanto en el diseño de dispositivos y apósitos para proteger las heridas y para evitar las fugas de las larvas como también en el esclarecimiento de procesos fisiológicos y moleculares de las ES larvales. Como perspectiva, se espera, con la participación de varios grupos e investigadores, que los compuestos derivados de las ES larvales sean sintetizados mediante tecnologías del DNA recombinante en aras de ser utilizados en las funciones que cumplen las larvas en las heridas crónicas, lo cual no es nada fácil su eventual reemplazo en razón al complejo e indispensable papel que estos organismos cumplen en las heridas.

Literatura citada

- BAER, WS. 1931. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the Blowfly). J. Bone Joint Surg 13: 438-75 p.
- BEXFIELD, A; NIGAM, Y; THOMAS, S; RATCLIFFE, NA. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbes Infect. 2004. 6: 1297-1304.
- BUCHMAN, J; BLAIR, JE. 1932. Maggots and their use in the treatment of chronic osteomyelitis. Surg Gynecol Obstet 55: 177-190
- CHAMBERS, L; WOODROW, S; BROWN, AP; HARRIS, PD; PHILIPS, D; HALL, M. 2003. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds Br. J. Dermatol. 148: 14-23.
- CHERNIN, E. 1986. Surgical Maggots. Southern Medical Journal 79: 1143-45.
- CHURCH, S. 1996. The traditional use of maggots in wound healing and the development of larval therapy (biosurgery) in modern medicine. J Altern Complement Med 2: 525-527.
- DUNBAR, G.K. 1944, 'Notes on the Ngemba Tribe of the Central Darling River, Western New South Wales, concluded, Mankind. 320 p.
- FRYKBERG, RG; ARMSTRONG, DG; GIURINI, J; EDWARDS, A; KRAVETTE, M; KRAVITZ, S; ROSS, C; STAVOSKY, J; STUCK, R; VANORE, J. 2006. American College of Foot and Ankle Surgeons. Diabetic foot disorders: a clinical practice guideline. J Foot Ankle Surg 39: S1-60 p.
- GRASSBERGER, M; FLEISCHMANN, W. 2002. The biobag: a new device for the application of medicinal maggots. Dermatology 204: 306.
- HARDING, KG; MORRIS, HL; PATEL, GK. 2002. Healing chronic wounds BMJ 324:160-163.
- HARRIS, LG; BEXFIELD, A; NIGAM, Y; ROHDE, H; RATCLIFFE, NA; MACK, D. 2009. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. Int. J. Artif. Organs 32: 555-64.

- HOROBIN, AJ; SHAKESHEFF, K. M; WOODROW, S; ROBINSON, C; PRITCHARD, D. I. 2003. Maggots and wound healing: The effects of *Lucilia sericata* larval secretions upon human dermal fibroblasts. Br. J. Dermatol 148: 923-933.
- JIANG, K; SUN, X; WANG, W; LIU, L; CAI, Y; CHEN, Y; LUO, N; YU, J; CAI, D; WANG, A. 2012. Excretions/Secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. PLoS One. 7(11):e49815. doi: 10.1371 p.
- JONES, M; THOMAS, S. 2000. Larval therapy. Nurs Stand. 14: 47-51.
- MECER, M; MCCLELLAN, R. 1935. Surgical maggots, a study of their functions in wound healing. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 20: 1219 p.
- MCGUCKIN, M; KERSTEIN, MD. 1998. Venous leg ulcers and the family physician. Adv. Wound Care 11: 344–6 p.
- MUMCUOGLU, KY; INGBER, A; GILEAD, L; STESSMAN, J; FRIEDMANN, R; SCHULMAN, H; BICHUCHER, H; IOFFE-USPENSKY, I; MILLER, J; GALUN, R; RAZ, I. 1998. Maggot therapy for treatment of intractable wounds. Diabetes Care 21:2030-2031 p.
- MUMCUOGLU, KY. 2001. Clinical applications for maggots in wound care. American Journal of Clinical Dermatology 4: 219-227.
- NIGAM, Y; BEXFIELD, A; THOMAS, S; RATCLIFFE, NA. 2006. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part II-Maggots Combat Infection. Evid Based Complement Alternat Med 3: 303-308.
- PAUL, AG; AHMAD, NW; LEE, HL; ARIFF, AM; SARANUM, M; NAICKER, AS; OSMAN, Z. 2009. Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. Int. Wound. J. 6: 39-46.
- PRETE, PE. 1997. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. Life Sci 60: 505–510 p.
- REY, M; CASTAÑEDA, A; GONZÁLEZ, J; ACERO, VM; SEGURA, NA; BELLO, F. 2010. Evaluación de la terapia larval aplicada a cuatro casos clínicos de animales en Bogotá (Colombia). Revista Colombiana de Entomología 36: 254-259.
- ROBINSON, W. 1935. Stimulation of healing in non-healing wounds by allantoin in maggot secretions and of wide biological distribution J Bone. Joint Surg 17: 267-271.
- ROBINSON, W. 1940. Ammonium bicarbonate secreted by surgical maggots stimulates healing in purulent wounds. Am. J. Surg. 47: 111–115 p.
- SHERMAN, RA; WYLE, F; VULPE, M; LEUSE, L; CASTILLO, L. 1993. The utility of maggot therapy for treating chronic wounds. Am J Trop Med Hyg; 49: 266 p.
- SHERMAN, RA; PECHTER, EA. 1988. Maggot therapy a review of a therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis Med. Vet. Entomol. 2: 225-30 p.
- SHERMAN, RA; WYLE, FA. 1996. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics, and schools. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54: 38-41.
- SHERMAN, RA. 1997. A new dressing design for use with maggot therapy. Plast Reconstr Surg; 100: 451–456.
- SHERMAN, RA; WYLE, F. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. Annual Review of Entomology 45: 55-81.
- SHERMAN, RA. 2009. Maggot Therapy Takes Us Back to the Future of Wound Care: New and Improved Maggot Therapy for the 21st Century. Journal of Diabetes Science and Technology 3: 336–344.

- SPILSBURY, K; CULLUM, N; DUMVILLE, J; O'MEARA, S; PETHERICK, E; THOMPSON, C. 2008. Exploring patient perceptions of larval therapy as a potential treatment for venous leg ulceration. *Health Expect.* 11:148-159.
- STEWART, MS. 1934. The role of *Lucilia sericata* meig: larvae in osteomyelitis wounds. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 28: 445-60.
- TARSHIS, MS. 1938. Surgical maggots in modern medicine. *The Scientific Monthly* 47: 252-257.
- TELFORD, G; BROWN, AP; SEABRA, RA; HOROBIN, AJ; RICH, A; ENGLISH JSC; PRITCHARD, DI. 2010. Degradation of eschar from venous leg ulcers using a recombinant chymotrypsin from *Lucilia sericata*. *Br. J. Dermatol.* 163: 523-31.
- TÉLLEZ, G; ACERO, M; PINEDA, LA; CASTAÑO, J. 2012. Larvaterapia aplicada a heridas con poca carga de tejido necrótico y caracterización enzimática de la excreción, secreción y hemolinfa de larvas. *Biomédica* 32: 312-320.
- THOMAS, S; JONES, M; SHUTLER, S; JONES, S. 1996. Using larvae in modern wound management. *J Wound Care* 5: 60-69.
- THOMAS, AML; HARDING, KG; MOORE, K. 1999. The structure and composition of chronic wound eschar. *J. Wound Care* 8: 285-286.
- VAN DER PLAS, MJ; JUKEMA, G; WAI1, SW; DOGTEROM-BALLERING, H; LAGENDIJK, EL; VAN GULPEN, C; VAN DISSEL, J; BLOEMBERG, G; NIBBERING, P. 2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother* 61: 117-122.
- VAN DER PLAS, MJ; BALDRY, M; VAN DISSEL, JT; JUKEMA, GN; NIBBERING, PH. 2009. Maggot secretions skew monocyte-macrophage differentiation away from a pro-inflammatory to a pro-angiogenic type. *PLoS One* 4: e8071 p.
- WOLFF, M; RIVERA, C; HERRERA, S; WOLFF, JC; ESCOBAR, MM. 2010. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), una nueva alternativa para la terapia larval y reporte de casos en Colombia. *IATREIA* 23: 107-116.
- WOLFF, H; HANSSON, C. 2005. Rearing larvae of *Lucilia sericata* for chronic ulcer treatment--an improved method. *Acta Derm Venereol* 85: 126-131.
- WOLLINA, U. 2002. Biosurgery supports granulation and debridement. *International Journal of Dermatology* 41: 635-639.
- ZIFFREN, SE; HEIST, HE; MAY, SC; WOMACK, NA. 1953. The secretion of collagenase of maggots and its implications *Ann Surg* 138: 932-934.